

## METHOD FOR ISOLATING AND REFINING NUCLEIC ACID

**Publication number:** JP2006238854 (A)

**Publication date:** 2006-09-14

**Inventor(s):** INOMATA HIROKO; HANTO RIE +

**Applicant(s):** FUJI PHOTO FILM CO LTD +

**Classification:**

- international: **C12N15/09; C12M1/00; C12N15/09; C12M1/00**

- European:

**Application number:** JP20050082283 20050322

**Priority number(s):** JP20040091681 20040326; JP20050027918 20050203; JP20050082283 20050322

### Abstract of JP 2006238854 (A)

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a simple and inexpensive method for isolating and refining a nucleic acid quickly, excellent in isolating performance and automating suitability, high in washing efficiency, thus enabling RNA or DNA to be selectively retrieved from a mixed sample of the RNA and DNA. ; **SOLUTION:** The method for isolating and refining RNA or DNA to selectively retrieve the RNA or DNA comprises (1) a step of passing a nucleic acid mixture solution containing the RNA and DNA through a nucleic acid-adsorbing porous membrane to effect adsorbing the nucleic acids, (2) a step of passing a washing liquid through the nucleic acid-adsorbing porous membrane to wash the membrane under nucleic acid adsorbed state and (3) a step of passing a retrieving liquid through the nucleic acid-adsorbing porous membrane to effect desorbing the nucleic acid off the membrane. In this method, the washing liquid is characterized by containing  $\leq 50$  mass% of a water-miscible organic solvent and containing no chaotropic salt. ; **COPYRIGHT:** (C)2006,JPO&NCPI

Data supplied from the *espacenet* database — Worldwide

(19) 日本国特許庁 (JP)

## (12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2006-238854

(P2006-238854A)

(43) 公開日 平成18年9月14日 (2006.9.14)

(51) Int. Cl.

F 1

テーマコード (参考)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00

A

4 B O 2 4

C 1 2 M 1/00 (2006.01)

C 1 2 M 1/00

A

4 B O 2 9

審査請求 未請求 請求項の数 22 O L (全 25 頁)

(21) 出願番号	特願2005-82283 (P2005-82283)	(71) 出願人	00005201
(22) 出願日	平成17年3月22日 (2005.3.22)		富士写真フイルム株式会社
(31) 優先権主張番号	特願2004-91681 (P2004-91681)	(74) 代理人	神奈川県南足柄市中沼2 1 0番地
(32) 優先日	平成16年3月26日 (2004.3.26)		100105647
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		弁理士 小栗 昌平
(31) 優先権主張番号	特願2005-27918 (P2005-27918)	(74) 代理人	100105474
(32) 優先日	平成17年2月3日 (2005.2.3)		弁理士 本多 弘徳
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(74) 代理人	100108589
			弁理士 市川 利光
		(74) 代理人	100115107
			弁理士 高松 猛
		(72) 発明者	猪股 弘子
			埼玉県朝霞市泉水3丁目1番46号 富士写真フイルム株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核酸の分離精製方法

## (57) 【要約】

【課題】 RNAとDNAの混合試料から、RNA又はDNAを選択的に回収することができ、分離性能に優れ、洗浄効率がよく、簡便で、迅速で、自動化適性に優れ、安価な核酸分離精製方法を提供する。

【解決手段】 (1) RNAとDNAを含む核酸混合物溶液を、核酸吸着性多孔膜内を通過させて、核酸を吸着させる工程、(2) 洗浄液を該核酸吸着性多孔膜に通過させて、核酸が吸着した状態で核酸吸着性多孔膜を洗浄する工程、(3) 回収液を該核酸吸着性多孔膜に通過させて、該多孔膜内から核酸を脱着させる工程を含み、該洗浄液が、水溶性有機溶媒を50質量%以下の濃度で含有し、かつカオトロピック塩を含有しない洗浄液であることを特徴とする、RNA又はDNAを選択的に回収する分離精製方法。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

(1) RNAとDNAを含む核酸混合物溶液を、核酸吸着性多孔膜内を通過させて、核酸を吸着させる工程、(2) 洗浄液を該核酸吸着性多孔膜に通過させて、核酸が吸着した状態で核酸吸着性多孔膜を洗浄する工程、および(3) 回収液を該核酸吸着性多孔膜に通過させて、該多孔膜内から核酸を脱着させる工程を含み、該洗浄液が、水溶性有機溶媒を50質量%以下の濃度で含有し、かつカオトロピック物質を含有しない洗浄液であることを特徴とする、RNA又はDNAを選択的に回収する分離精製方法。

## 【請求項 2】

上記洗浄液中の水溶性有機溶媒の濃度が、5～40質量%である、請求項1記載のRNA又はDNAを選択的に回収する分離精製方法。 10

## 【請求項 3】

核酸吸着性多孔膜が、イオン結合が関与しない弱い相互作用で核酸が吸着する、有機高分子からなる多孔膜である、請求項1又は2に記載のRNA又はDNAを選択的に回収する分離精製方法。

## 【請求項 4】

核酸吸着性多孔膜が、水酸基を有する有機高分子からなる多孔膜である、請求項1～3の何れかに記載のRNA又はDNAを選択的に回収する分離精製方法。

## 【請求項 5】

多孔膜がアセチル値の異なるアセチルセルロースの混合物を酸化处理した有機材料からなる多孔膜である請求項1～4の何れかに記載のRNA又はDNAの選択的分離精製方法。 20

## 【請求項 6】

多孔膜が、表裏非対称性の多孔膜である、請求項1～5の何れかに記載のRNA又はDNAの選択的分離精製方法。

## 【請求項 7】

試料溶液が、細胞またはウイルスを含む検体を核酸可溶性試薬で処理して得られた溶液に水溶性有機溶媒を添加した液である、請求項1～6の何れかに記載のRNA又はDNAの選択的分離精製方法。

## 【請求項 8】

細胞を含む検体が培養細胞からなる、請求項7に記載のRNA又はDNAの選択的分離精製方法。 30

## 【請求項 9】

細胞を含む検体が動物組織からなる、請求項7に記載のRNA又はDNAの選択的分離精製方法。

## 【請求項 10】

検体を核酸可溶性試薬添加前もしくは後にホモジナイズ処理する請求項7～9の何れかに記載のRNAの選択的分離精製方法。

## 【請求項 11】

核酸可溶性試薬がカオトロピック塩、核酸安定化剤、界面活性剤、緩衝剤及び消泡剤から選ばれる少なくとも一つを含む、請求項7に記載のRNA又はDNAの選択的分離精製方法。 40

## 【請求項 12】

カオトロピック物質が、塩酸グアニジンまたはグアニジンチオシアン酸塩から選ばれる少なくとも一つである請求項11に記載のRNA又はDNAの選択的分離精製方法。

## 【請求項 13】

水溶性有機溶媒が、メチルアルコール、エチルアルコール、プロピルアルコール及びその異性体、ならびにブチルアルコール及びその異性体から選択される少なくとも1種のアルコールである、請求項1～12の何れかに記載のRNA又はDNAの選択的分離精製方法。

## 【請求項 14】

洗浄液が、メチルアルコール、エチルアルコール、プロピルアルコール及びその異性体、ならびにブタノール及びその異性体から選択される少なくとも1種のアルコールを5～50質量%含む溶液である、請求項1～13の何れかに記載のRNA又はDNAの選択的分離精製方法。

## 【請求項 15】

洗浄液が水溶性塩を含む請求項1～14の何れかに記載のRNAの選択的分離精製方法

## 【請求項 16】

水溶性塩を10 mmol / L以上含む請求項15に記載のRNAの選択的分離精製方法 10

## 【請求項 17】

水溶性塩を10 mmol / L以上1 mol / L以下含む請求項15又は16に記載のRNAの選択的分離精製方法

## 【請求項 18】

洗浄液が、塩化物を10 mmol / L～1 mol / L含む溶液である、請求項1～17の何れかに記載のRNA又はDNAの選択的分離精製方法。

## 【請求項 19】

核酸吸着性多孔膜に吸着したRNAを脱着せしめうる回収液が、塩濃度が0.5 mol / L以下の溶液である、請求項1～18の何れかに記載のRNA又はDNAの選択的分離精製方法。 20

## 【請求項 20】

前記(1)、(2)及び(3)の各工程において、核酸を含む試料溶液、洗浄液又は回収液の核酸吸着性多孔膜への通過を、少なくとも二個の開口を有する容器内に溶液が内部を通過可能な核酸吸着性多孔膜を収容した核酸分離精製カートリッジ及び圧力発生装置を用いて行い、且つ、該圧力発生装置が、核酸分離精製カートリッジの一の開口に着脱可能に結合されるポンプである請求項1～19の何れかに記載のRNA又はDNAの選択的分離精製方法。

## 【請求項 21】

請求項1～20の何れかに記載の核酸分離精製工程を行うための、核酸分離精製カートリッジと試薬のキット。 30

## 【請求項 22】

請求項1～20の何れかに記載の核酸分離精製方法を自動で行う装置。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、核酸を分離精製する方法に関する。より詳細には、本発明は、RNAとDNAを含む核酸混合物からRNA又はDNAを分離精製する方法に関する。さらに詳しくは、少なくとも二個の開口を有する容器内に核酸吸着性多孔膜を収容した核酸分離精製カートリッジと圧力発生装置を用いて、RNAとDNAを含む核酸混合物からRNA又はDNAを分離精製する方法に関する。 40

## 【背景技術】

## 【0002】

核酸は、様々な分野で種々の形態で使用されている。例えば、組換え核酸技術の領域においては、核酸をプローブ、ゲノム核酸、およびプラスミド核酸の形態で用いることが要求される。

## 【0003】

診断分野においても、核酸は種々の形態で種々の目的に用いられている。例えば、核酸プローブは、ヒトの病原体の検出および診断に日常的に用いられている。同様に核酸は遺伝障害の検出に用いられている。核酸はまた食品汚染物質の検出にも用いられている。さ 50

らに、核酸は遺伝地図の作製からクローニングおよび組換え発現におよぶ種々の理由により、興味ある核酸の位置確認、同定および単離において日常的に用いられている。

【0004】

多くの場合、核酸は極めて少量でしか入手できず、そして単離および精製操作が煩雑で時間を要する。このしばしば時間を消費する煩雑な操作は核酸の損失に結びつきやすい。

血清、尿およびバクテリアのカルチャーから得られた試料から核酸を精製する場合には、コンタミネーション（汚染）および疑陽性の結果が生じるという危険性も加わる。

【0005】

広く知られた分離精製方法の一つに、核酸を二酸化珪素、シリカポリマー、珪酸マグネシウム等の固相に吸着させ、これに引き続いて洗浄、脱着等の操作を行い、分離精製する方法がある（例えば、特許文献1）。この方法は、分離性能として優れているが、簡便性、迅速性、自動化適性において充分とは言えず、またこの方法に用いられる器具及び装置は自動化及び小型化に不向きであり、更に器具及び装置、特に吸着体を同一性能で工業的に大量生産することが困難であり、かつ取扱いが不便で、種々の形状に加工したい等の問題点がある。さらに、素材自体が脆いために機械的強度を得るには一定以上の厚みが必要となるため、特にDNAとRNAの混合試料からRNAを選択的に回収する際、DNAse等の高価な試薬を用いる必要がある等の問題がある。

10

【0006】

また、簡便かつ効率よく核酸を分離精製する方法の一つとして、固相に核酸を吸着させる溶液及び固相から核酸を脱着させる溶液をそれぞれ用いて、表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相に核酸を吸着及び脱着させることによって、核酸を分離精製する方法が記載されている（特許文献2、3）。

20

【0007】

その他に、従来から知られている核酸分離精製法としては、遠心法によるもの、磁気ビーズを用いるもの、フィルターを用いるものなどがあり、これらを利用した核酸分離精製装置が提案されている。例えば、フィルターを用いた核酸分離装置としては、フィルターを収容したフィルターチューブをラックに多数セットし、これに核酸を含む試料液を分注し、上記ラックの底部の周囲をシール材を介してエアチャンバーで密閉して内部を減圧し、全フィルターチューブを同時に排出側より吸引し試料液を通過させて核酸をフィルターに吸着し、その後、洗浄液および回収液を分注して、同様に減圧吸引して洗浄・脱着するようにした機構が提案されている（例えば、特許文献4参照）。

30

【特許文献1】特公平7-51065号公報

【特許文献2】特開2003-128691号公報

【特許文献3】特開2004-49108号公報

【特許文献4】特許第2832586号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

しかしながら、従来の核酸分離精製方法では、DNAとRNAが混在する混合溶液からDNA又はRNAを効率的に精度良く分離精製する方法については別記記載されていない。

40

従って本発明の目的は、検体中の核酸を核酸吸着性の多孔膜に吸着させた後、洗浄等を経て脱着させて核酸を分離精製するより安価な方法であって、分離性能に優れ、洗浄効率が高く、簡便で、迅速で、自動化適性に優れ、実質的に同一の分離性能を有するものを大量に生産可能である多孔膜を使用した核酸の分離精製方法を提供することにある。特にRNAとDNAの混合試料から、RNA又はDNAを選択的に回収する、より安価な分離精製方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討した結果、RNAとDNAを含む核酸

50

混合物を多孔膜に吸着及び脱着させる過程を含む核酸の分離精製方法において、洗浄液中のアルコール濃度を50質量%以下にすることで、DNAを溶解させ、RNA又はDNAを選択的に分離精製できることを見出し、本発明を完成したものである。更に本発明では、回収液として塩濃度が0.5M以下の水溶液を用いることによって、RNAを高純度で、かつ高収量で分離精製することができる。

また、本発明では、該多孔膜としてイオン結合が関与しない相互作用で核酸が吸着する多孔膜を用いることが本発明の効果をj得る上で好ましく、更に、本発明においては、二個の開口を有する容器内に有機高分子からなる多孔膜を収容した核酸分離精製カートリッジを使用することが好ましい。

即ち、本発明は、下記の構成よりなるものである。

10

【0010】

1. (1) RNAとDNAを含む核酸混合物溶液を、核酸吸着性多孔膜内を通過させて、核酸を吸着させる工程、(2) 洗浄液を該核酸吸着性多孔膜に通過させて、核酸が吸着した状態で核酸吸着性多孔膜を洗浄する工程、および(3) 回収液を該核酸吸着性多孔膜に通過させて、該多孔膜内から核酸を脱着させる工程を含み、該洗浄液が、水溶性有機溶媒を50質量%以下の濃度で含有し、かつカオトロピック物質を含有しない洗浄液であることを特徴とする、RNA又はDNAを選択的に回収する分離精製方法。

【0011】

2. 上記洗浄液中の水溶性有機溶媒の濃度が、5~40質量%である、上記第1項記載のRNA又はDNAを選択的に回収する分離精製方法。

20

【0012】

3. 核酸吸着性多孔膜が、イオン結合が関与しない弱い相互作用で核酸が吸着する、有機高分子からなる多孔膜である、上記第1項又は第2項に記載のRNA又はDNAを選択的に回収する分離精製方法。

【0013】

4. 核酸吸着性多孔膜が、水酸基を有する有機高分子からなる多孔膜である、上記第1~3項の何れかに記載のRNA又はDNAを選択的に回収する分離精製方法。

【0014】

5. 多孔膜がアセチル値の異なるアセチルセルロースの混合物を酸化处理した有機材料からなる多孔膜である上記第1~4項の何れかに記載のRNAの選択的分離精製方法。

30

【0015】

6. 多孔膜が、表裏非対称性の多孔膜である、上記第1~5項の何れかに記載のRNA又はDNAの選択的分離精製方法。

【0016】

7. 試料溶液が、細胞またはウイルスを含む検体をRNA可溶化試薬で処理して得られた溶液に水溶性有機溶媒を添加した液である、上記第1~6項の何れかに記載のRNA又はDNAの選択的分離精製方法。

【0017】

8. 細胞を含む検体が培養細胞からなる、上記第7項に記載のRNA又はDNAの選択的分離精製方法。

40

【0018】

9. 細胞を含む検体が動物組織からなる、上記第7項に記載のRNA又はDNAの選択的分離精製方法。

【0019】

10. 検体を核酸可溶化試薬添加前もしくは後にホモジナイズ処理する上記第7~9項の何れかに記載のRNAの選択的分離精製方法。

【0020】

11. 核酸可溶化試薬が、カオトロピック塩、核酸安定化剤、界面活性剤、緩衝剤及び消泡剤から選ばれる少なくとも一つを含む、上記第7項に記載のRNA又はDNAの選択的分離精製方法。

50

## 【0021】

12. カオトロピック物質が、塩酸グアニジンまたはグアニジンチオシアン酸塩から選ばれる少なくとも一つである上記第11項に記載のRNA又はDNAの選択的分離精製方法。

## 【0022】

13. 水溶性有機溶媒が、メチルアルコール、エチルアルコール、プロピルアルコール及びその異性体、ならびにブチルアルコール及びその異性体から選択される少なくとも1種のアルコールである、上記第1~12項の何れかに記載のRNA又はDNAの選択的分離精製方法。

## 【0023】

14. 洗浄液が、メチルアルコール、エチルアルコール、プロピルアルコール及びその異性体、ならびにブタノール及びその異性体から選択される少なくとも1種のアルコールを5~50質量%含む溶液である、上記第1~13項の何れかに記載のRNA又はDNAの選択的分離精製方法。

## 【0024】

15. 洗浄液が水溶性塩を含む上記第1~14項の何れかに記載のRNAの選択的分離精製方法。

## 【0025】

16. 水溶性塩を10mmol/L以上含む上記第15項に記載のRNAの選択的分離精製方法。

## 【0026】

17. 水溶性塩を10mmol/L以上1mol/L以下含む上記第15項又は16項に記載のRNAの選択的分離精製方法。

## 【0027】

18. 洗浄液が、塩化物を10mmol/L~1mol/L含む溶液である、上記第1~17項のいずれかに記載のRNA又はDNAの選択的分離精製方法。

## 【0028】

19. 核酸吸着性多孔膜に吸着したRNAを脱着せしめる回収液が、塩濃度が0.5mol/L以下の溶液である、上記第1~18項の何れかに記載のRNA又はDNAの選択的分離精製方法。

## 【0029】

20. 前記(1)、(2)及び(3)の各工程において、核酸を含む試料溶液、洗浄液又は回収液の核酸吸着性多孔膜への通過を、少なくとも二個の開口を有する容器内に溶液が内部を通過可能な核酸吸着性多孔膜を収容した核酸分離精製カートリッジを用いて行うものである上記第1~19項の何れかに記載のRNA又はDNAの選択的分離精製方法。

## 【0030】

21. 核酸を含む試料溶液、洗浄液又は回収液の核酸吸着性多孔膜への通過を、圧力発生装置を用いて行い、且つ、該圧力発生装置が、核酸分離精製カートリッジの一の開口に着脱可能に結合されるポンプである上記第1~20項の何れかに記載のRNA又はDNAの選択的分離精製方法。

## 【0031】

22. 上記第1~21項の何れかに記載の核酸分離精製工程を行うための、核酸分離精製カートリッジと試薬のキット。

## 【0032】

23. 上記第1~22項の何れかに記載の核酸分離精製方法を自動で行う装置。

## 【発明の効果】

## 【0033】

本発明によれば、分離性能に優れ、洗浄効率がよく、簡便で、迅速で、自動化および小型化適性に優れ、実質的に同一の分離性能を有するものを大量に生産可能である多孔膜を使用した核酸の分離精製方法であって、DNAとRNAの混合試料から、より安価で、簡

10

20

30

40

50

便にRNA又はDNAを選択的に回収することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0034】

本発明の核酸分離精製方法は、(1)RNAとDNAを含む核酸混合物溶液を、核酸吸着性多孔膜内を通過させて、核酸を吸着させる工程、(2)洗浄液を該核酸吸着性多孔膜に通過させて、核酸が吸着した状態で核酸吸着性多孔膜を洗浄する工程、(3)回収液を該核酸吸着性多孔膜に通過させて、該多孔膜内から核酸を脱着させる工程を少なくとも含むものである。

【0035】

好ましくは、上記(1)、(2)及び(3)の各工程において、DNAとRNAを含む核酸混合物溶液、洗浄液又は回収液を、圧力発生装置を用いて核酸吸着性多孔膜に通過させるものであり、より好ましくは、上記(1)、(2)及び(3)の各工程において、少なくとも二個の開口を有する容器内に該核酸吸着性多孔膜を収容した核酸分離精製カートリッジの開口に、核酸を含む試料溶液、洗浄液、又は回収液を注入し、カートリッジの上記の開口に結合された圧力差発生装置を用いてカートリッジ内を加圧状態にして、注入した各液を通過させ、他の開口より排出させるものである。DNAとRNAを含む核酸混合物溶液、洗浄液、又は回収液を加圧状態で上記多孔膜に通過させることにより、装置をコンパクトに自動化することができ、好ましい。ポンプの加圧は、好ましくは10~300kPa、より好ましくは40~200kPaの範囲で行われる。

【0036】

さらに好ましくは、上記核酸吸着性多孔膜を収容する核酸分離精製カートリッジを用いて、以下の工程でRNAとDNAを分離精製することができる。

すなわち、(a)DNAとRNAを含む核酸混合物溶液を、少なくとも二個の開口を有する容器内に、溶液が内部を通過可能な、核酸吸着性多孔膜を収容した核酸分離精製カートリッジの開口に注入する工程、(b)核酸分離精製カートリッジの上記の開口に結合された圧力差発生装置を用いて核酸分離精製カートリッジ内を加圧状態にし、注入したDNAとRNAを含む核酸混合物溶液を、核酸吸着性多孔膜を通過させ、核酸分離精製カートリッジの他の開口より排出することによって、核酸吸着性多孔膜内に核酸を吸着させる工程、(c)核酸分離精製カートリッジの上記の開口に洗浄液を注入する工程、(d)核酸分離精製カートリッジの上記の開口に結合された圧力差発生装置を用いて核酸分離精製カートリッジ内を加圧状態にし、注入した洗浄液を、核酸吸着性多孔膜を通過させ、他の開口より排出することによって、核酸吸着性多孔膜を、核酸が吸着した状態で、洗浄する工程、(e)核酸分離精製カートリッジの上記の開口に回収液を注入する工程、(f)核酸分離精製カートリッジの開口に結合された圧力差発生装置を用いて核酸分離精製カートリッジ内を加圧状態にし、注入した回収液を、核酸吸着性多孔膜を通過させ、他の開口より排出することによって、核酸吸着性多孔膜内から核酸を脱着させ、核酸分離精製カートリッジ容器外に排出する工程が挙げることができる。

【0037】

上記の核酸分離精製の工程では、最初の核酸を含む試料液を注入から核酸分離精製カートリッジ外に核酸を得るまでの工程を実質20分以内、好適な状況では2分以内で終了することが可能である。

【0038】

また、上記の核酸分離精製の工程では、紫外可視分光光度計での測定値(260nm/280nm)が、DNAの場合は1.6~2.0、RNAの場合は1.8~2.2となる純度を持つ核酸を回収することができ、不純物混入量の少ない高純度の核酸を定常的に得ることができる。さらには、紫外可視分光光度計での測定値(260nm/280nm)がDNAの場合は1.8付近、RNAの場合は2.0付近となる純度を持つ核酸を回収することができる。

【0039】

また、上記工程において、圧力差発生装置としては、注射器、ピペット、ペリスタポン

10

20

30

40

50



プのような加圧が可能なポンプ等、或いは、エバポレーター等の減圧可能なものが挙げられる。これらの内、手動操作には注射器が、自動操作にはポンプが適している。また、ビベッタは片手操作が容易にできるという利点を有する。好ましくは、圧力差発生装置は、核酸分離精製カートリッジの一の開口に着脱可能に結合されている。

【0040】

また、上記工程において、上記核酸分離精製カートリッジの他の開口に結合された圧力差発生装置を用いて核酸分離精製カートリッジ内を減圧状態にしても好適に実施できる。また、核酸分離精製カートリッジに遠心力を作用させることによっても好適に実施することができる。

【0041】

本発明において使用できる検体は、核酸を含むものであれば特に制限はなく、例えば診断分野においては、検体として採取された全血、血漿、血清、尿、便、精液、唾液等の体液、あるいは植物（又はその一部）、動物（またはその一部）、細菌、ウイルス、培養細胞など、あるいはそれらの溶解物およびホモジネートなどの生物材料から調製された溶液が対象となる。培養細胞としては、浮遊系細胞、接着系細胞等が挙げられる。浮遊系細胞とは培養液中で容器壁に付着することなく漂いながら生育、増殖する細胞を指し、例えばHL60、U937、HeLaS3等が代表的な細胞株として挙げられる。接着系細胞とは培養液中で容器壁底面に付着し生育、増殖する細胞を指し、例えばNIH3T3、HEK293、HeLa、COS、CHO細胞等が代表的な細胞株として挙げられる。動物（またはその一部）検体として用いられるものに動物組織が挙げられる。動物を解剖したときに採取できる、肝臓、腎臓、脾臓、脳、心臓、肺や胸腺など個体を構成する組織全てを使用することができる。

【0042】

これらの検体は、通常、細胞膜・核膜を溶解して核酸を溶出する試薬を含む水溶液（核酸可溶性試薬）で処理する。これにより細胞膜・核膜が溶解されて、核酸が水溶液内に分散し、核酸を含む試料溶液を得る。

【0043】

以下に、細胞膜・核膜を溶解し、核酸を溶出して、検体から核酸を含む試料溶液を得る工程について説明する。該工程は、通常、(I)細胞又はウイルスを含む検体を容器に注入する工程、(II)上記容器に、カオトロピック塩、核酸安定化剤、界面活性剤、緩衝剤及び消泡剤いずれか1つ以上を含む核酸可溶性試薬溶液を添加し、検体と核酸可溶性試薬溶液を混合する工程、及び(III)上記で得られた混合液に水溶性有機溶媒を添加する工程を包含む。

【0044】

細胞膜・核膜を溶解して核酸を溶出するには、核酸可溶性試薬を用いる。核酸可溶性試薬としては、カオトロピック塩、核酸安定化剤、界面活性剤、緩衝剤及び消泡剤いずれか1つ以上を含む溶液が挙げられる。

【0045】

上記、核酸可溶性試薬中のカオトロピック塩濃度は、 $0.5\text{ mol/L}$ 以上であることが好ましく、より好ましくは $0.5\text{ mol/L} \sim 8\text{ mol/L}$ 、さらに好ましくは、 $1\text{ mol/L} \sim 6\text{ mol/L}$ である。前記カオトロピック塩としては、特に限定は無く公知のカオトロピック塩を使用することができる。カオトロピック塩としては、グアニジン塩、イソチアン酸ナトリウム、ヨウ化ナトリウム、ヨウ化カリウム等を使用することができる。中でもグアニジン塩が好ましい。グアニジン塩としては、塩酸グアニジン、イソチアン酸グアニジン、グアニジンチオシアン酸塩（チオシアン酸グアニジン）が挙げられ、中でも塩酸グアニジンまたはグアニジンチオシアン酸塩が好ましい。これらの塩は単独でも、複数組み合わせてもよい。

【0046】

上記、核酸可溶性試薬中の界面活性剤は、例えば、ノニオン界面活性剤、カチオン界面活性剤、アニオン界面活性剤、両性界面活性剤である。本発明においてはノニオン界面活

10

20

30

40

50

性剤を好ましく用いることができる。ノニオン界面活性剤は、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル系界面活性剤、ポリオキシエチレンアルキルエーテル系界面活性剤、脂肪酸アルカノールアミドを用いることができるが、好ましくは、ポリオキシエチレンアルキルエーテル系界面活性剤を用いることができる、さらに好ましくは、ポリオキシエチレンアルキルエーテル系界面活性剤は、POEデシルエーテル、POEラウリルエーテル、POEトリデシルエーテル、POEアルキレンデシルエーテル、POEソルビタンモノラウレート、POEソルビタンモノオレート、POEソルビタンモノステアレート、テトラオレイン酸ポリオキシエチレンソルビット、POEアルキルアミン、POEアセチレングリコールから選択されるポリオキシエチレンアルキルエーテル系界面活性剤である。

【0047】

また、カチオン界面活性剤も好ましく用いることができる。さらに好ましくは、カチオン界面活性剤は、セチルトリメチルアンモニウムブロミド、ドデシルトリメチルアンモニウムクロリド、テトラデシルトリメチルアンモニウムクロリド、セチルピリジニウムクロリドから選択されるカチオン界面活性剤である。これらの界面活性剤は、単独または複数組み合わせて用いてもよい。これら界面活性剤の核酸可溶性試薬溶液における濃度は0.1~20質量%であることが好ましい。

【0048】

核酸可溶性試薬には、核酸安定化剤を共存させることが好ましい。検体中には、核酸を分解するヌクレアーゼ等が含まれていることがあり、検体をホモジナイズすると、ヌクレアーゼが核酸に作用し、収量が減少することがある。これを回避する目的で、核酸可溶性液に、ヌクレアーゼを不活性化させる作用を有する安定化剤を共存させることができる。これにより、核酸の回収量及び回収率が向上し、検体の微量化及び迅速化が可能となる。

【0049】

ヌクレアーゼの不活性化剤としては、一般的に還元剤を好ましく用いることができる。還元剤としては、水素、ヨウ化水素、硫化水素、水素化アルミニウムリチウム、水素化ホウ素ナトリウム等の水素化合物、アルカリ金属、マグネシウム、カルシウム、アルミニウム、亜鉛等の電気的陽性の大きい金属、またはそのアマルガム、アルデヒド類、糖類、辛酸、シュウ酸などの有機酸化合物、等が上げられるが、メルカプト化合物が好ましい。メルカプト化合物は、N-アセチルシステイン、メルカプトエタノールや、アルキルメルカプタン等が上げられるが、特に限定されない。メルカプト化合物は、前処理液として、0.1~20質量%の濃度で、より好ましくは、0.5~15質量%で用いることができる。

【0050】

上記核酸可溶性試薬には、消泡剤を含有させることも好ましい。上記消泡剤としては、シリコン系消泡剤とアルコール系消泡剤の2つの成分が好ましく挙げられ、また、アルコール系消泡剤としては、アセチレングリコール系界面活性剤が好ましい。

【0051】

消泡剤の具体例としては、シリコン系消泡剤（例えば、シリコンオイル、ジメチルポリシロキサン、シリコンエマルジョン、変性ポリシロキサン、シリコンコンパウンドなど）、アルコール系消泡剤（例えば、アセチレングリコール、ヘプタノール、エチルエキサノール、高級アルコール、ポリオキシアルキレングリコールなど）、エーテル系消泡剤（例えば、ヘプチルセロソルブ、ノニルセロソルブ-3-ヘプチルコリビートルなど）、油脂系消泡剤（例えば、動植物油など）、脂肪酸系消泡剤（例えば、ステアリン酸、オレイン酸、パルミチン酸など）、金属セッケン系消泡剤（例えば、ステアリン酸アルミ、ステアリン酸カルシウムなど）、脂肪酸エステル系消泡剤（例えば、天然ワックス、トリブチルホスフェートなど）、リン燐酸エステル系消泡剤（例えば、オクチルリン酸ナトリウムなど）、アミン系消泡剤（例えば、ジアミルアミンなど）、アミド系消泡剤（例えば、ステアリン酸アミドなど）、その他の消泡剤（例えば、硫酸第二鉄、ボーキサイトなど）などが挙げられる。特に好ましくは、消泡剤として、シリコン系消泡剤とアルコール系

10

20

30

40

50

消泡剤の2つの成分を組み合わせる使用することができる。また、アルコール系消泡剤としては、アセチレングリコール系界面活性剤を使用することも好ましい。

#### 【0052】

また、上記の核酸可溶性試薬溶液は水溶性有機溶媒を含んでいても良い。この水溶性有機溶媒は、核酸可溶性試薬に含まれる各種試薬の溶解性を上げることを目的としており、アセトン、クロロホルム、ジメチルホルムアミド等が挙げられるが、アルコールが好ましい。アルコールは、1級アルコール、2級アルコール、3級アルコールのいずれでも良い。アルコールがメチルアルコール、エチルアルコール、プロピルアルコール及びその異性体、ブチルアルコール及びその異性体をより好ましく用いることができる。これらの水溶性有機溶媒は単独または複数組み合わせ用いてもよい。これら水溶性有機溶媒の核酸可溶性試薬溶液における濃度は1～20質量%であることが好ましい。

#### 【0053】

上記の核酸可溶性試薬溶液は、好ましくはpH3～8、より好ましくはpH4～7、さらに好ましくはpH5～7のものを用いられる。

本発明で用いる緩衝材の具体例としては、通常用いられるpH緩衝剤(buffer)を挙げることができる。好ましくは、生化学用のpH緩衝剤が挙げられる。このような緩衝剤としては、クエン酸塩、リン酸塩または酢酸塩から成る緩衝剤、Tris-HCl、TE(Tris-HCl/EDTA)、TBE(Tris-Borate/EDTA)、TAE(Tris-Acetate/EDTA)、グッド緩衝剤が挙げられる。グッド緩衝剤としては、MES(2-Morpholinoethanesulfonic acid)、Bis-Tris(Bis(2-hydroxyethyl)iminotris(hydroxymethyl)methane)、HEPES(2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid)、PIPES(Piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid))、ACES(N-(2-Acetamido)-2-aminoethanesulfonic acid)、CAPS(N-Cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic acid)、TES(N-Tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethanesulfonic acid)が挙げられる。

これらの緩衝剤は、前記核酸可溶性試薬中の濃度は1～500mmol/Lであることが好ましい。

#### 【0054】

細胞膜・核膜を溶解し、核酸を可溶化して、検体から核酸を含む試料溶液を得る工程について説明する。細胞膜・核膜を溶解し、核酸を可溶化して、検体から核酸を含む試料溶液を得る工程において、核酸可溶性試薬を添加する前もしくは後に検体をホモジナイズ処理することで、自動化処理適正が向上する。ホモジナイズ処理は、例えば、超音波処理、鋭利な突起物を用いる、高速攪拌処理を用いる、微細空隙から押し出す処理、ガラス、ステンレス、ジルコニア等のビーズを用いる処理等で行うことができる。これらの処理を行なうため、例えば、ボルテックスなどのミキサーや、Rotor-Stator型、ポッター型、ダウンス型などのホモジナイザーや、ビーズミル、ベッスル、フレンチプレス、グライNDER、ブレードホモジナイザー、など市販のホモジナイザーいしも使用することができる。核酸可溶性試薬を添加する前にホモジナイズ処理する場合は、検体を液体窒素で凍らせた後、ビーズミルやクラッシャーミル、すり鉢、粉砕機などで処理することもできる。

#### 【0055】

ホモジナイズした検体とカオトロピック塩、核酸安定化剤、界面活性剤、緩衝剤及び消泡剤いずれか1つ以上を含む核酸可溶性試薬試薬とを混合する方法は、特に限定されない。混合する際、攪拌装置により30から3000rpmで1秒から3分間混合することが好ましい。これにより、分離精製される核酸収量を増加させることができる。または、転倒混和を5から30回行うことで混合することも好ましい。また、ピペティング操作を、10から50回行うことによっても混合することができる。この場合、簡便な操作で分離精製される核酸収量を増加させることができる。

#### 【0056】

検体が培養細胞や酵母などの場合は、10個～1×10<sup>8</sup>個の細胞数に対して、核酸可

10

20

30

40

50

溶化試薬 50 ~ 1000  $\mu$ l で処理することが望ましい。検体が動物や植物などの組織の場合は、組織量 0.1 mg ~ 200 mg に対して、核酸可溶化試薬 50 ~ 1000  $\mu$ l で処理することが望ましい。検体が細菌の場合は、 $1 \times 10^8$  個 ~  $1 \times 10^{10}$  個の細菌に対して、核酸可溶化試薬 50 ~ 1000  $\mu$ l で処理することが望ましい。検体が溶解し、かつ、カトリッジの容量を超えない範囲で核酸可溶化試薬の液量を変えることができる。

【0057】

細胞膜・核膜を溶解し、核酸を可溶化して、検体から核酸を含む試料溶液を得る工程において、次に上記混合液に水溶性有機溶媒を添加する。混合液に添加する水溶性有機溶媒は、アルコールを好ましく用いることができる。アルコールは、1級アルコール、2級アルコール、3級アルコールのいずれでもよく、メチルアルコール、エチルアルコール、プロピルアルコール、ブチルアルコール及びその異性体を好ましく用いることができる。これら水溶性有機溶媒の核酸を含む試料溶液における最終濃度は、5 ~ 90 質量%であることが好ましい。混合する際、攪拌装置により 30 から 3000 rpm で 1 秒から 3 分間混合することが好ましい。これにより、分離精製される核酸収量を増加させることができる。または、転倒混和を 5 から 30 回行うことで混合することも好ましい。また、ピペティング操作を、10 から 50 回行うことによっても混合することができる。

【0058】

また、得られた核酸を含む試料溶液は、表面張力は  $0.05 \text{ J/m}^2$  以下であることが好ましく、また、粘度は、 $1 \sim 10000 \text{ mPa}$  であることが好ましく、比重は、 $0.8 \sim 1.2$  であることが好ましい。こうした物性の溶液にすることで、次の工程において、試料溶液を核酸吸着性多孔膜に接触後に、試料溶液を除去しやすくする。

【0059】

以下に、本発明で用いる核酸吸着性多孔膜および吸着工程について説明する。

本発明の核酸吸着性多孔膜は、溶液が内部を通過可能なものである。ここで「溶液が内部を通過可能」とは、膜の一方の面が接する空間と膜の他方の面が接する空間の間に圧力差を生じさせた場合に、高圧の空間側から低圧の空間側へと、膜の内部を溶液が通過することが可能であることを意味する。または、膜に遠心力を掛けた場合に、遠心力の方向に、膜の内部を溶液が通過することが可能であることを意味する。

【0060】

また、本発明の核酸吸着性多孔膜は、イオン結合が実質的に関与しない相互作用で核酸が吸着する多孔膜であることが好ましい。これは、多孔膜側の使用条件で「イオン化」していないことを意味し、環境の極性を変化させることで、核酸と多孔膜が引き合うようになると推定される。これにより分離性能に優れ、しかも洗浄効率よく、核酸を単離精製することができる。好ましくは、核酸吸着性多孔膜は、親水基を有する多孔膜であり、環境の極性を変化させることで、核酸と多孔膜の親水基同士が引きあうようになると推定される。

【0061】

ここで親水基とは、水との相互作用を持つことができる有極性の基（原子団）を指し、核酸の吸着に関与する全ての基（原子団）が当てはまる。親水基としては、水との相互作用の強さが中程度のもの（化学大辞典、共立出版（株）発行、「親水基」の項の「あまり親水性の強くない基」参照）が良く、例えば、水酸基、カルボキシル基、シアノ基、オキシエチレン基などを挙げることができる。好ましくは水酸基である。

【0062】

本発明において、親水基を有する多孔膜とは、多孔膜を形成する材料自体が、親水性基を有する多孔膜、または多孔膜を形成する材料を処理またはコーティングすることによって親水基を導入した多孔膜を意味する。多孔膜を形成する材料は有機物、無機物のいずれでも良い。例えば、多孔膜を形成する材料自体が親水基を有する有機材料である多孔膜、親水基を持たない有機材料の多孔膜を処理して親水基を導入した多孔膜、親水基を持たない有機材料の多孔膜に対し親水基を有する材料でコーティングして親水基を導入した多孔膜、多孔膜を形成する材料自体が親水基を有する無機材料である多孔膜、親水基を持たな

10

20

30

40

50

い無機材料の多孔膜を処理して親水基を導入した多孔膜、親水基を持たない無機材料の多孔膜に対し親水基を有する材料でコーティングして親水基を導入した多孔膜などを、使用することができるが、加工の容易性から、多孔膜を形成する材料は有機高分子などの有機材料を用いることが好ましい。

【0063】

親水基を有する材料の多孔膜としては、ポリヒドロキシエチルアクリル酸、ポリヒドロキシエチルメタアクリル酸、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリアクリル酸、ポリメタアクリル酸、ポリオキシエチレン、アセチルセルロース、アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物などで、形成された多孔膜を挙げることができるが、特に水酸基を有する有機材料の多孔膜を好ましく使用することができる。

10

【0064】

水酸基を有する有機材料の多孔膜として、多糖構造を有する材料が好ましく、アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物から成る有機高分子の多孔膜をより好ましく使用することができる。アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物として、トリアセチルセルロースとジアセチルセルロースの混合物、トリアセチルセルロースとモノアセチルセルロースの混合物、トリアセチルセルロースとジアセチルセルロースとモノアセチルセルロースの混合物、ジアセチルセルロースとモノアセチルセルロースの混合物を好ましく使用する事ができる。特にトリアセチルセルロースとジアセチルセルロースの混合物を好ましく使用することができる。トリアセチルセルロースとジアセチルセルロースの混合比（質量比）は、99：1～1：99である事が好ましく、90：10～50：50である事がより好ましい。

20

【0065】

更に好ましい水酸基を有する有機材料としては、特開2003-128691号公報に記載のアセチルセルロースの酸化物が挙げられる。アセチルセルロースの酸化物とは、アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物を酸化处理したものであり、トリアセチルセルロースとジアセチルセルロース混合物の酸化物、トリアセチルセルロースとモノアセチルセルロース混合物の酸化物、トリアセチルセルロースとジアセチルセルロースとモノアセチルセルロース混合物の酸化物、ジアセチルセルロースとモノアセチルセルロース混合物の酸化物も好ましく使用することができる。より好ましくは、トリアセチルセルロースとジアセチルセルロース混合物の酸化物を使用することである。トリアセチルセルロースとジアセチルセルロース混合物の混合比（質量比）は、99：1～1：99であることが好ましい。更に好ましくは、トリアセチルセルロースとジアセチルセルロース混合物の混合比は、90：10～50：50であることである。この場合、酸化处理の程度（酸化率）で固相表面の水酸基の量（密度）をコントロールすることができる。核酸の分離効率をあげるためには、水酸基の量（密度）が多い方が好ましい。例えば、トリアセチルセルロースなどのアセチルセルロースの場合には、酸化率（表面酸化率）が約5%以上であることが好ましく、10%以上であることが更に好ましい。また、水酸基を有する有機高分子の表面積を大きくするために、アセチルセルロースの多孔膜を酸化处理することが好ましい。この場合、多孔膜は、表裏対称性の多孔膜であってもよいが、裏非対称性の多孔膜を好ましく使用することができる。

30

40

【0066】

酸化处理とは、アセチルセルロースを酸化处理液（例えば水酸化ナトリウム水溶液）に接触させることを言う。これにより、酸化处理液に接触したセルロースのエステル誘導体のエステル基が加水分解され、水酸基が導入され再生セルロースとなる。こうして作成された再生セルロースは、本来のセルロースとは、結晶状態等の点で異なっている。また、酸化率を変えるには、水酸化ナトリウムの濃度や処理時間を変えて酸化处理を行えば良い。酸化率は、NMR、IR又はXPSにより、容易に測定することができる（例えば、カルボニル基のピーク減少の程度で定めることができる）。

【0067】

親水基を持たない有機材料の多孔膜に親水基を導入する方法として、ポリマー鎖内また

50

は側鎖に親水基を有するグラフトポリマー鎖を多孔膜に結合することができる。有機材料の多孔膜にグラフトポリマー鎖を結合する方法としては、多孔膜とグラフトポリマー鎖とを化学結合させる方法と、多孔膜を起点として重合可能な二重結合を有する化合物を重合させグラフトポリマー鎖とする2つの方法がある。

【0068】

まず、多孔膜とグラフトポリマー鎖とを化学結合にて付着させる方法においては、ポリマーの末端または側鎖に多孔膜と反応する官能基を有するポリマーを使用し、この官能基と、多孔膜の官能基とを化学反応させることでグラフトさせることができる。多孔膜と反応する官能基としては、多孔膜の官能基と反応し得るものであれば特に限定はないが、例えば、アルコキシシランのようなシランカップリング基、イソシアネート基、アミノ基、水酸基、カルボキシ基、スルホン酸基、リン酸基、エポキシ基、アリル基、メタクリロイル基、アクリロイル基等を挙げることができる。ポリマーの末端、または側鎖に反応性官能基を有するポリマーとして特に有用な化合物は、トリアルコキシシリル基をポリマー末端に有するポリマー、アミノ基をポリマー末端に有するポリマー、カルボキシ基をポリマー末端に有するポリマー、エポキシ基をポリマー末端に有するポリマー、イソシアネート基をポリマー末端に有するポリマーが挙げられる。この時に使用されるポリマーとしては、核酸の吸着に関与する親水基を有するものであれば特に限定はないが、具体的には、ポリヒドロキシエチルアクリル酸、ポリヒドロキシエチルメタアクリル酸及びそれらの塩、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸及びそれらの塩、ポリオキシエチレンなどを挙げることができる。

【0069】

多孔膜を基点として重合可能な二重結合を有する化合物を重合させ、グラフトポリマー鎖を形成させる方法は、一般的には表面グラフト重合と呼ばれる。表面グラフト重合法とは、プラズマ照射、光照射、加熱などの方法で基材表面上に活性種を与え、多孔膜と接するように配置された重合可能な二重結合を有する化合物を重合によって多孔膜と結合させる方法を指す。基材に結合しているグラフトポリマー鎖を形成するのに有用な化合物は、重合可能な二重結合を有しており、核酸の吸着に関与する親水基を有するという、2つの特性を兼ね備えていることが必要である。これらの化合物としては、分子内に二重結合を有していれば、親水基を有するポリマー、オリゴマー、モノマーのいずれの化合物をも用いることができる。特に有用な化合物は親水基を有するモノマーである。特に有用な親水基を有するモノマーの具体例としては、次のモノマーを挙げることができる。例えば、2-ヒドロキシエチルアクリレート、2-ヒドロキシエチルメタクリレート、グリセロールモノメタクリレート等の水酸性基含有モノマーを特に好ましく用いることができる。また、アクリル酸、メタアクリル酸等のカルボキシ基含有モノマー、もしくはそのアルカリ金属塩及びアミン塩も好ましく用いることができる。

【0070】

親水基を持たない有機材料の多孔膜に親水基を導入する別の方法として、親水基を有する材料をコーティングすることができる。コーティングに使用する材料は、核酸の吸着に関与する親水基を有するものであれば特に限定はないが、作業の容易さから有機材料のポリマーが好ましい。ポリマーとしては、ポリヒドロキシエチルアクリル酸、ポリヒドロキシエチルメタアクリル酸及びそれらの塩、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸及びそれらの塩、ポリオキシエチレン、アセチルセルロース、アセチル値の異なるアセチルセルロースの混合物などを挙げることができるが、多糖構造を有するポリマーが好ましい。

【0071】

また、親水基を持たない有機材料の多孔膜に、アセチルセルロースまたは、アセチル値の異なるアセチルセルロースの混合物をコーティングした後に、コーティングしたアセチルセルロースまたは、アセチル値の異なるアセチルセルロースの混合物を酸処理することもできる。この場合、酸化率が約5%以上であることが好ましい。さらには、酸化率が約10%以上であることが好ましい。

10

20

30

40

50

## 【0072】

親水基を有する無機材料である多孔膜としては、シリカ化合物を含有する多孔膜を挙げることができる。シリカ化合物を含有する多孔膜としては、ガラスフィルターを挙げることもできる。また、特許公報第3058342号に記載されているような、多孔質のシリカ薄膜を挙げることができる。この多孔質のシリカ薄膜とは、二分子膜形成能を有するカチオン型の両親媒性物質の展開液を基板上に展開した後、基板上の液膜から溶媒を除去することによって両親媒性物質の多層二分子膜薄膜を調整し、シリカ化合物を含有する溶液に多層二分子膜薄膜を接触させ、次いで前記多層二分子膜薄膜を抽出除去することで作製することができる。

## 【0073】

親水基を持たない無機材料の多孔膜に親水基を導入する方法としては、多孔膜とグラフトポリマー鎖とを化学結合させる方法と、分子内に二重結合を有している親水基を有するモノマーを使用して、多孔膜を起点として、グラフトポリマー鎖を重合する2つの方法がある。多孔膜とグラフトポリマー鎖とを化学結合にて付着させる場合は、グラフトポリマー鎖の末端の官能基と反応する官能基を無機材料に導入し、そこにグラフトポリマーを化学結合させる。また、分子内に二重結合を有している親水基を有するモノマーを使用して、多孔膜を起点として、グラフトポリマー鎖を重合する場合は、二重結合を有する化合物を重合する際の起点となる官能基を無機材料に導入する。

## 【0074】

親水性基を持つグラフトポリマー、および分子内に二重結合を有している親水基を有するモノマーとしては、上記、親水基を持たない有機材料の多孔膜とグラフトポリマー鎖とを化学結合させる方法において、記載した親水性基を持つグラフトポリマー、および分子内に二重結合を有している親水基を有するモノマーを好ましく使用することができる。

## 【0075】

親水基を持たない無機材料の多孔膜に親水基を導入する別の方法として、親水基を有する材料をコーティングすることもできる。コーティングに使用する材料は、核酸の吸着に與する親水基を有するものであれば特に限定はないが、作業の容易さから有機材料のポリマーが好ましい。ポリマーとしては、ポリヒドロキシエチルアクリル酸、ポリヒドロキシエチルメタアクリル酸及びそれらの塩、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸及びそれらの塩、ポリオキシエチレン、アセチルセルロース、アセチル値の異なるアセチルセルロースの混合物などを挙げることもできる。

## 【0076】

また、親水基を持たない無機材料の多孔膜に、アセチルセルロースまたは、アセチル値の異なるアセチルセルロースの混合物をコーティングした後に、コーティングしたアセチルセルロースまたは、アセチル値の異なるアセチルセルロースの混合物を酸処理することもできる。この場合、酸化率が約5%以上であることが好ましい。さらには、酸化率が約10%以上であることが好ましい。

## 【0077】

親水基を持たない無機材料の多孔膜としては、アルミニウム等の金属、ガラス、セメント、陶磁器等のセラミックス、もしくはニューセラミックス、シリコン、活性炭等を加工して作製した多孔膜を挙げることができる。

## 【0078】

上記の核酸吸着性多孔膜は、溶液が内部を通過可能であり、厚さが $10\mu\text{m} - 500\mu\text{m}$ である。さらに好ましくは、厚さが $50\mu\text{m} - 250\mu\text{m}$ である。洗浄がし易い点で、厚さが薄いほど好ましい。

## 【0079】

上記の溶液が内部を通過可能な核酸吸着性多孔膜は、最小孔径が $0.22\mu\text{m}$ 以上である。さらに好ましくは、最小孔径が $0.5\mu\text{m}$ 以上である。また、最大孔径と最小孔径の比が2以上である多孔膜を用いる事が好ましい。これにより、核酸が吸着するのに十分な表面積が得られるとともに、目詰まりし難い。さらに好ましくは、最大孔径と最小孔径の

10

20

30

40

50

比が5以上である。

【0080】

上記の溶液が内部を通過可能な核酸吸着性多孔膜は、空隙率が50～95%である。さらに好ましくは、空隙率が65～80%である。また、バブルポイントが、0.1～10kgf/cm<sup>2</sup>である事が好ましい。さらに好ましくは、バブルポイントが、0.2～4kgf/cm<sup>2</sup>である。

【0081】

上記の、溶液が内部を通過可能な核酸吸着性多孔膜は、圧力損失が、0.1～100kPaである事が好ましい。これにより、過圧時に均一な圧力が得られる。さらに好ましくは、圧力損失が、0.5～50kPaである。ここで、圧力損失とは、膜の厚さ100μmあたり、水を通過させるのに必要な最低圧力である。

【0082】

上記の、溶液が内部を通過可能な核酸吸着性多孔膜は、25℃で1kg/cm<sup>2</sup>の圧力で水を通過させたときの透水量が、膜cm<sup>2</sup>あたり1分間で1～5000mLであることが好ましい。さらに好ましくは、25℃で1kg/cm<sup>2</sup>の圧力で水を通過させたときの透水量が、膜cm<sup>2</sup>あたり1分間で5～1000mLである。

【0083】

上記の、溶液が内部を通過可能な核酸吸着性多孔膜は、多孔膜1mgあたりの核酸の吸着量が0.1μg以上である事が好ましい。さらに好ましくは、多孔膜1mgあたりの核酸の吸着量が0.9μg以上である。

【0084】

上記の、溶液が内部を通過可能な核酸吸着性多孔膜は、一辺が5mmの正方形の多孔膜をトリフルオロ酢酸5mLに浸漬したときに、1時間以内では溶解しないが48時間以内に溶解するセルロース誘導体が、好ましい。また、一辺が5mmの正方形の多孔膜をトリフルオロ酢酸5mLに浸漬したときに1時間以内に溶解するが、ジクロロメタン5mLに浸漬したときには24時間以内に溶解しないセルロース誘導体がさらに好ましい。

【0085】

核酸吸着性多孔膜中を、核酸を含む試料溶液を通過させる場合、試料溶液を一方の面から他方の面へと通過させることが、液を多孔膜へ均一に接触させることができる点で、好ましい。核酸吸着性多孔膜中を、核酸を含む試料溶液を通過させる場合、試料溶液を核酸吸着性多孔膜の孔径が大きい側から小さい側に通過させることが、目詰まりし難い点で好ましい。

【0086】

核酸を含む試料溶液を核酸吸着性多孔膜を通過させる場合の流速は、液の多孔膜への適切な接触時間を得るために、膜の面積cm<sup>2</sup>あたり、2～1500μL/secである事が好ましい。

液の多孔膜への接触時間が短すぎると十分な分離精製効果が得られず、長すぎると操作性の点から好ましくない。さらに、上記流速は、膜の面積cm<sup>2</sup>あたり、5～700μL/secである事が好ましい。

【0087】

また、使用する溶液が内部を通過可能な核酸吸着性多孔膜は、1枚であってもよいが、複数枚を使用することもできる。複数枚の核酸吸着性多孔膜は、同一のものであっても、異なるものであってもよい。

【0088】

複数枚の核酸吸着性多孔膜は、無機材料の核酸吸着性多孔膜と有機材料の核酸吸着性多孔膜との組合せであっても良い。例えば、ガラスフィルターと再生セルロースの多孔膜との組合せを挙げることができる。また、複数枚の核酸吸着性多孔膜は、無機材料の核酸吸着性多孔膜と有機材料の核酸非吸着性多孔膜との組合せであってもよい、例えば、ガラスフィルターと、ナイロンまたはポリスルホンの多孔膜との組合せを挙げることができる。

【0089】

少なくとも二個の開口を有する容器内に、上記のような溶液が内部を通過可能な核酸吸着性多孔膜を収容した核酸分離精製カートリッジを好ましく使用することができ。また

10

20

30

40

50



、少なくとも二個の開口を有する容器内に、上記のような溶液が内部を通過可能な核酸吸着性多孔膜を複数枚収容した核酸分離精製カートリッジを好ましく使用することができる。この場合、少なくとも二個の開口を有する容器内に収容される複数枚の核酸吸着性多孔膜は、同一のものであっても、異なるものであっても良い。

【0090】

核酸分離精製カートリッジは、少なくとも二個の開口を有する容器内に、上記のような溶液が内部を通過可能な核酸吸着性多孔膜を収容する以外、その他の部材を収容していないことが好ましい。上記の容器の材料としては、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリカーボネート、ポリ塩化ビニルなどのプラスチックを使用することができる。また、生分解性の材料も好ましく使用することができる。また、上記の容器は透明であっても、着色してあっても良い。

10

【0091】

核酸分離精製カートリッジとして、個々の核酸分離精製カートリッジを識別する手段を備えている核酸分離精製カートリッジを使用する事ができる。個々の核酸分離精製カートリッジを識別する手段としては、バーコード、磁気テープなどが挙げられる。

【0092】

また、少なくとも二個の開口を有する容器内から核酸吸着性多孔膜を容易に取り出す事が可能になっている構造を有した核酸分離精製カートリッジを使用することもできる。

【0093】

以下、洗浄工程について説明する。

20

本発明に従い、本発明の洗浄液を核酸吸着性多孔膜に通過させることにより、DNAを溶解させ、RNAのみを吸着させておき、必要な核酸を含む検体の量を微量とすることがができる。即ち、洗浄液を流した液はDNAを分離することが可能となる。

【0094】

本発明の洗浄液は、水溶性有機溶媒を50質量%以下の濃度で含有する水溶液であり、好ましくは水溶性有機溶媒を1質量%以上50質量%以下の濃度で含有する水溶液である。洗浄液は、核酸吸着性多孔膜に核酸と共に吸着した試料溶液中の不純物を洗い流す機能を有する必要がある。そのためには、核酸吸着性多孔膜から核酸は脱着させないが不純物は脱着させる組成であることが必要である。

【0095】

洗浄液に含まれる水溶性有機溶媒の割合が多すぎると、洗浄工程でDNAが溶解できない。従って、回収液で回収したRNA液中にDNAのコンタミが増大する。また少なすぎると、洗浄工程でDNAだけでなく、RNAが多孔膜から脱着してしまい、回収液中のRNA量が減ってしまう。そのため、洗浄液に含まれる水溶性有機溶媒の割合は50質量%以下であり、好ましくは5~40質量%である。

30

【0096】

洗浄液に含まれる水溶性有機溶媒としては、メタノール、エタノール、イソプロパノール、n-イソプロパノール、ブタノール、などのアルコールを用いることができ、中でもエタノールを用いることが好ましい。

【0097】

本発明の洗浄液は、更に水溶性塩を含有することが好ましい。水溶性塩としては、ハロゲン化物の塩であることが好ましく、中でも塩化物が好ましい。また、水溶性塩は、一個または二個のカチオンであることが好ましく、特にアルカリ金属塩、アルカリ土類金属塩が好ましく、中でもナトリウム塩、カリウム塩及びリチウム塩が好ましくナトリウム塩が最も好ましい。

40

水溶性塩が洗浄液に含まれる場合、その濃度は10mmol/L以上であることが好ましく、その上限は不純物の溶解性を損なわない範囲であれば特に問わないが、1mol/L以下であることが好ましく、0.1mol/L以下であることがより好ましい。より好ましくは、水溶性塩が塩化ナトリウムであり、さらには、塩化ナトリウムが20mmol/L以上含まれていることである。

50

## 【0098】

更に、洗浄液は、カオトロピック物質を含んでいないことを特徴とする。それによって、洗浄工程に引き続く回収工程にカオトロピック物質が混入する可能性を減らすことができる。回収工程時に、カオトロピック物質が混入すると、しばしばPCR反応等の酵素反応を阻害するので、後の酵素反応等を考慮すると洗浄液にカオトロピック物質を含まないことが理想的である。また、カオトロピック物質は、腐食性で有害であるので、この点でもカオトロピック物質を用いないで済むことは、実験者にとっても試験操作の安全上極めて有利である。カオトロピック物質が含まれないため、紫外可視分光光度計での測定値（260nm/230nm）が、1.5以上の高純度な核酸を回収することができる。好適な状況では、紫外可視分光光度計での測定値（260nm/230nm）が2.0付近となる高純度な核酸を回収することができる。

10

ここで、カオトロピック物質とは、前記したように尿素、イソチオシアネート酸 Guanidine、チオシアネート酸 Guanidine、イソチアネート酸 ナトリウム、ヨウ化ナトリウム、ヨウ化カリウムなどである。

## 【0099】

従来、核酸分離精製工程における洗浄工程の際、洗浄液がカートリッジなどの容器に対して濡れ性が高いため、しばしば洗浄液が容器中に残留することになり、洗浄工程に続く回収工程への洗浄液の混入して核酸の純度の低下や次工程における反応性の低下などの原因となっている。したがって、カートリッジなどの容器を用いて核酸の吸着及び脱着を行う場合、吸着、洗浄時に用いる液、特に洗浄液が、次の工程に影響を及ぼさないように、カートリッジ内に洗浄残液が残留しないことは重要である。

20

## 【0100】

したがって、洗浄工程における洗浄液が次工程の回収液に混入することを防止して、洗浄液のカートリッジ内への残留を最小限に留めるため、洗浄液の表面張力を0.035J/m<sup>2</sup>未満にすることが好ましい。表面張力が低いと、洗浄液とカートリッジの濡れ性が向上し、残留する液量を抑えることができる。

## 【0101】

ここで、洗浄効率を上げる為に、水の割合を増やすことができるが、この場合、洗浄液の表面張力は上昇し、残留する液量が増える。洗浄液の表面張力が0.035J/m<sup>2</sup>以上の場合は、カートリッジの撥水性を高めることで、残留する液量を抑えることができる。カートリッジの撥水性を高めることで、液滴を形成させ、その液滴が流れ落ちることによって残留する液量が抑制できる。撥水性を高める方法としては、カートリッジ表面にシリコン等の撥水剤をコートするか、カートリッジ成型時にシリコン等の撥水剤を練り込む等の手段があるが、これに限らない。

30

## 【0102】

また、洗浄や回収操作を自動化することによって、操作が簡便かつ迅速に行うことができる。洗浄工程は、迅速化のためには1回の洗浄で済ませてもよく、また純度がより重要な場合には複数回洗浄を繰り返すことが好ましい。

## 【0103】

洗浄工程において、洗浄液は、チューブ、ピペット、又は自動注入装置、もしくはこれらと同じ機能をもつ供給手段を使用して、核酸吸着性多孔膜を収容した核酸分離精製カートリッジへ供給される。供給された洗浄液は、核酸分離精製カートリッジの一の開口（核酸を含む試料溶液を注入した開口）から供給され、該開口に結合された圧力差発生装置（例えばスライド、注射器、ポンプ、パワーピペットなど）を用いて核酸分離精製カートリッジ内を加圧状態にして核酸吸着性多孔膜を通過させ、一の開口と異なる開口より排出させることができる。また、洗浄液を一の開口から供給し、同じ一の開口より排出させることもできる。さらには、核酸分離精製カートリッジの核酸を含む試料溶液を供給した一の開口と異なる開口より洗浄液を供給し、排出させることも可能である。しかしながら、核酸分離精製カートリッジの一の開口から供給し、核酸吸着性多孔膜を通過させ、一の開口と異なる開口より排出する方法が洗浄効率が優れてより好ましい。洗浄工程における洗浄

40

50

液の液量は、 $2\mu\text{ l}/\text{cm}^2$ 以上が好ましい。洗浄液量が多量であれば洗浄効果は向上するが、操作性を保ち、試料の流出を抑止するためには、 $200\mu\text{ l}/\text{cm}^2$ 以下が好ましい。

【0104】

洗浄工程において、洗浄液を核酸吸着性多孔膜に通過させる場合の流速は、膜の単位面積 ( $\text{cm}^2$ ) あたり、 $2\sim 1500\mu\text{ l}/\text{sec}$ であることが好ましく、 $5\sim 700\mu\text{ l}/\text{sec}$ であることがより好ましい。通過速度を下げて時間を掛ければ洗浄がそれだけ十分に行なわれることになるが、核酸の分離精製操作の迅速化も重要であるので上記した範囲が選択される。

【0105】

洗浄工程において、洗浄液の液温は $4\sim 70^\circ\text{C}$ であることが好ましい。さらには、洗浄液の液温を室温とすることがより好ましい。また洗浄工程において、その核酸分離精製カートリッジを機械的な振動や超音波による攪拌を与えながら、または遠心分離により洗浄することもできる。

【0106】

本発明に従い、核酸吸着性多孔膜を利用することにより洗浄工程を簡素化することができる。すなわち、(1) 洗浄液が核酸吸着性多孔膜を通過する回数を1回でよい、(2) 洗浄工程を室温でできる、(3) 洗浄後、直ちに回収液をカートリッジに注入することができる、(4) 前記(1)、(2)、(3)のいずれかが1つもしくは2つ以上のものである。従来法においては、洗浄液中に含まれる有機溶媒を迅速に取り除くため、しばしば乾燥工程を必要としたが、本発明に係る核酸吸着性多孔膜は薄膜であるためにこれを省略できるからである。

【0107】

従来、核酸分離精製工程において、洗浄工程の際、しばしば洗浄液が飛散し他に付着することによって、試料のコンタミネーション(汚染)が起きることが問題となっている。洗浄工程におけるこの種のコンタミネーションは、二個の開口を有する容器内に核酸吸着性多孔膜を収容した核酸分離精製カートリッジと廃液容器の形状とを工夫することによって抑止することができる。

【0108】

次いで、核酸吸着性多孔膜からRNAを脱着させて回収する工程について示す。

回収工程において、回収液は、チューブ、ビベット、又は自動注入装置、もしくはこれらと同じ機能をもつ供給手段を使用して、核酸吸着性多孔膜を装着した核酸分離精製カートリッジへ供給される。回収液は、核酸分離精製カートリッジの一の開口(核酸を含む試料溶液を注入した開口)から供給され、該開口に結合された圧力差発生装置(例えばスボイド、注射器、ポンプ、パワービベットなど)を用いて核酸分離精製カートリッジ内を加圧状態にして核酸吸着性多孔膜を通過させ、一の開口と異なる開口より排出させることができる。また、回収液を一の開口から供給し、同じ一の開口より排出させることもできる。さらには、核酸分離精製カートリッジの核酸を含む試料溶液を供給した一の開口と異なる開口より回収液を供給し、排出させることも可能である。しかしながら、核酸分離精製カートリッジの一の開口から供給し、核酸吸着性多孔膜を通過させ、一の開口と異なる開口より排出する方法が回収効率が高いためより好ましい。

【0109】

検体から調整した核酸を含む試料溶液の体積に対して、回収液の体積を調整して核酸の脱着を行うことができる。分離精製された核酸を含む回収液量は、そのとき使用する検体量による。一般的によく使われる回収液量は数10から数100 $\mu\text{ l}$ であるが、検体量が極微量である時や、逆に大量の核酸を分離精製したい場合には回収液量は $1\mu\text{ l}$ から数10mlの範囲で変える事ができる。

【0110】

回収液としては好ましくは精製蒸留水、Tris/EDTA/ツッファー等が使用できる。また、回収した核酸をPCR(ポリメラーゼ連鎖反応)に供する場合、PCR反応において用いる緩衝溶液(例えば、KCl 50mmol/L、Tris-HCl 10mmol/L、MgCl<sub>2</sub> 1.5mmol/Lを最終濃度とする水溶液)を用いることもできる。

10

20

30

40

50

## 【0111】

回収液のpHは、pH2～11であることが好ましい。さらには、pH5～9であることが好ましい。回収液は、500mmol/L以下のイオン強度であることが好ましく、更には50～0.01mmol/Lの塩濃度であることが好ましい。また特にイオン強度と塩濃度は吸着核酸の溶出に効果を及ぼす。回収液は、290mmol/L以下のイオン強度であることが好ましく、さらには、90mmol/L以下の塩濃度であることが好ましい。こうすることで、核酸の回収率が向上し、より多くの核酸を回収することができる。

## 【0112】

回収液の体積を当初の核酸を含む試料溶液の体積と比較して少なくすることによって、濃縮された核酸を含む回収液を得ることができる。好ましくは、(回収液体積):(試料溶液体積) = 1:100～99:100、更に好ましくは、(回収液体積):(試料溶液体積) = 1:10～9:10にすることができる。これにより核酸分離精製後工程において濃縮のための操作をすることなく、簡単に核酸を濃縮できる。これらの方法により検体よりも核酸が濃縮されている核酸溶液を得る方法を提供できる。

10

## 【0113】

また別の方法としては、回収液の体積を当初の核酸を含む試料溶液よりも多い条件で核酸の脱着を行うことにより、希望の濃度の核酸を含む回収液を得ることができ、次工程(PCRなど)に適した濃度の核酸を含む回収液を得ることができる。好ましくは、(回収液体積):(試料溶液体積) = 1:1～50:1、更に好ましくは、(回収液体積):(試料溶液体積) = 1:1～5:1にすることができる。これにより核酸分離精製後に濃度調整をする煩雑さがなくなるというメリットを得られる。更に、十分量の回収液を使用することにより、多孔膜からの核酸回収率の増加を図ることができる。

20

## 【0114】

また、目的に応じて回収液の温度を変化させることで簡単に核酸を回収することができる。例えば、回収液の温度を0～10℃にして多孔膜からの核酸の脱着を行うことで、酵素による分解を防止する何らかの試薬や特別な操作を加えることなく核酸分解酵素の働きを抑制して、核酸の分解を防ぎ、簡単に、効率よく核酸溶液を得ることができる。

## 【0115】

また、回収液の温度を10～35℃とした場合、一般的な室温で核酸の回収を実施することが出来、複雑な工程を必要とせずに核酸を脱着させて分離精製することができる。

30

## 【0116】

また別の方法としては、回収液の温度を高温、例えば35～70℃することで、多孔膜からの核酸の脱着を煩雑な操作を経ず簡単に高い回収率で実施することができる。

## 【0117】

回収液の注入回数は限定されるものではなく、1回でも複数回でもよい。通常、迅速、簡単に核酸を分離精製する場合は、1回の回収で実施するが、大量の核酸を回収する場合等複数回にわたり回収液を注入する事がある。

## 【0118】

回収工程においては、核酸の回収液をその後の後工程に使用できる組成にしておくことが可能である。分離精製された核酸は、しばしばPCR(ポリメラーゼチェーンリアクション)法により増幅される。この場合、分離精製された核酸溶液はPCR法に適したバッファ液で希釈する必要がある。本方法による回収工程において、回収液にPCR法に適したバッファ液を用いることで、その後のPCR工程へ簡単に、迅速に移行することができる。

40

## 【0119】

また、回収工程において、核酸の回収液に回収した核酸の分解を防ぐための安定化剤を添加しておくことも可能である。安定化剤としては、抗菌剤、抗力ヒナ剤や核酸分解抑制剤などを添加することができる。核酸分解酵素の阻害剤としてはEDTAなどが上げられる。

また別の実施態様として、回収容器にあらかじめ安定化剤を添加しておくこともできる。

## 【0120】

50

また、回収工程で用いられる回収容器には特に限定はないが、260nmの吸収が無い素材で作製された回収容器を用いることができる。この場合、回収した核酸溶液の濃度を、他の容器に移し替えずに測定できる。260nmに吸収のない素材は、例えば石英ガラス等が挙げられるがそれに限定されるものではない。

#### 【0121】

上記の、少なくとも二個の開口を有する容器内に核酸吸着性多孔膜を収容した核酸分離精製カートリッジと圧力発生装置を用いて、核酸を含む検体から核酸を分離精製する工程は、工程を自動で行う自動装置を用いて行うことが好ましい。それにより、操作が簡便化および迅速化するだけでなく、作業者の技能によらず一定の水準の、核酸を得ることが可能になる。

10

#### 【0122】

以下に、少なくとも二個の開口を有する容器内に核酸吸着性多孔膜を収容した核酸分離精製カートリッジと圧力発生装置を用いて、核酸を含む検体から核酸を分離精製する工程を自動で行う自動装置の例を示すが、自動装置はこれの限定されるものではない。

#### 【0123】

自動装置は、溶液が内部を通過可能な、核酸吸着性多孔膜を収容した核酸分離精製カートリッジを用い、該核酸分離精製カートリッジに核酸を含む試料液を注入し加圧して該試料液中の核酸を前記核酸吸着性多孔膜に吸着させた後、前記核酸分離精製カートリッジに洗浄液を分注し加圧して不純物を除去した後、前記核酸分離精製カートリッジに、回収液を分注し核酸吸着性多孔膜に吸着した核酸を脱着して回収液とともに回収する、分離精製動作を自動的に行う核酸分離精製装置であって、前記核酸分離精製カートリッジ、前記試料液および洗浄液の排出液を収容する廃液容器および前記核酸を含む回収液を収容する回収容器を保持する搭載機構と、前記核酸分離精製カートリッジに加圧エアを導入する加圧エア供給機構と、前記核酸分離精製カートリッジに洗浄液および回収を分注する分注機構とを備えらるることを特徴とするものである。

20

#### 【実施例】

#### 【0124】

##### (1) 核酸精製カートリッジの作製

内径7mm、核酸吸着性多孔膜を収容する部分を持つ核酸精製カートリッジを作製する。

30

#### 【0125】

(2) 核酸吸着性多孔膜として、トリアセチルセルロースの多孔膜を酸化处理した多孔膜を使用し、上記(1)で作成した核酸精製カートリッジの核酸吸着性多孔膜収納部に収容する。

#### 【0126】

##### 【実施例1】

##### (3) 核酸可溶性試薬溶液及び洗浄液の調製

下記に示す処方の核酸可溶性試薬溶液及び洗浄液を調製する。

#### 【0127】

##### (核酸可溶性試薬溶液)

塩酸グアニジン (ライフテクノロジ社製)	382g
Tris (ライフテクノロジ社製)	12.1g
TritonX-100 (ICN製)	10g
蒸留水	1000ml になるように添加
(1.0容量%の2-メルカプトエタノールを使用前に添加。)	

40

#### 【0128】

##### (洗浄液)

10mM Tris-HCl	20~50%エタノール
---------------	-------------

#### 【0129】

50

## (4) 核酸精製操作

ヒト前骨髄性白血病細胞 (HL60) 培養液を用意する。細胞数が  $1 \times 10^6$  個になるように調製し、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  フリー PBS で細胞を洗浄する。4℃、300g、5分、スイングローターで遠心し、浮遊細胞をペレット状にした後、上清を除去し、タッピングによって細胞を再懸濁する。ここへ核酸可溶化試薬溶液 350  $\mu$ l を加え、ボルテックスミキサーで1分間攪拌する。その後 70% エタノール 350  $\mu$ l を加え、ボルテックスミキサーで5秒間攪拌する。攪拌後、上記 (1) 及び (2) で作成した核酸吸着性多孔膜を有する核酸精製カートリッジの開口に注入し、続いて上記の開口に圧力差発生装置を結合し、核酸分離精製カートリッジ内を加圧状態にし、注入した核酸を含む試料溶液を、核酸吸着性多孔膜に通過させることで、核酸吸着性多孔膜に接触させ、核酸分離精製カートリッジの他の開口より排出する。続いて、上記核酸分離精製カートリッジの上記の開口に、エタノールを 20~50 % の濃度で含む洗浄液 500  $\mu$ l を注入し、上記の開口に圧力差発生装置を結合し、核酸分離精製カートリッジ内を加圧状態にし、注入した洗浄液を核酸吸着性多孔膜に通過させ、他の開口より排出し、この液を回収する。

【0130】

## (実施例及び比較例)

上記例における洗浄液として、表1及び表2に示すエタノールの濃度 (Tris-HC 1の濃度は一定) の洗浄液を用いる以外は、上記と同じ条件で、各操作を行った。

【0131】

## (5) 回収された核酸のアガロースゲル電気泳動

上記各試料において、回収された洗浄液、回収液中の核酸の量を 1% アガロースゲルの電気泳動から、その蛍光強度を求めることで、予め DNA 及び RNA の検量線を作成して、その濃度を求めた。表1には、回収液の DNA 及び RNA 濃度を、表2には、洗浄液の DNA 及び RNA の濃度を示した。

【0132】

【表1】

洗浄工程のエタノール濃度	回収液で回収した DNA 量	回収液で回収した RNA 量 ( $\mu$ g)
エタノール 20 %	0.0	3.2
エタノール 30 %	0.2	9.1
エタノール 40 %	1.1	8.4
エタノール 50 %	2.0	9.2
エタノール 70 %	5.2	10.5

【0133】

【表2】

洗浄工程のエタノール濃度	洗浄液で回収した DNA 量	洗浄液で回収した RNA 量 ( $\mu$ g)
エタノール 20 %	5.1	9.8
エタノール 30 %	5.0	0.1
エタノール 40 %	2.1	0.5
エタノール 50 %	2.0	0.4
エタノール 70 %	1.8	0.6

10

20

30

40

50

## 【0134】

表1及び表2の結果から明らかなように、洗浄工程でのエタノール濃度が50質量%以下のときはDNAの混入量が少ない。この結果から、本発明の方法を用いることにより、核酸回収液中のDNAの混入量を減少させ、RNAを選択的に回収することができることが分かる。

一方、洗浄液中のエタノール濃度が50質量%より高いと、DNAのコンタミネーションが多くなることが分かる。

## 【0135】

表1及び表2の結果から明らかなように、洗浄工程でのエタノール濃度が50質量%以下のときはDNAの混入量が少ない。この結果から、本発明の方法を用いることにより、核酸回収液中のDNAの混入量を減少させ、RNAを選択的に回収することができることが分かる。

10

一方、洗浄液中のエタノール濃度が50質量%より高いと、DNAのコンタミネーションが多くなることが分かる。

## 【0136】

## [実施例2]

## (6) 核酸可溶化試薬溶液及び洗浄液の調製

下記に示す処方の核酸可溶化試薬溶液及び洗浄液を調製する。

## 【0137】

## (核酸可溶化試薬溶液 - B1)

グアニジンチオシアン酸塩 (和光純薬社製) 3.5 M

BisTris (同仁化学社製) 0.25 M

塩酸を用いて、pH 6.5に調製

(1.0容量%の2-メルカプトエタノールを使用前に添加。)

20

## 【0138】

## (核酸可溶化試薬 - B2)

Tween 20 (和光純薬社製) 15 %

BisTris (同仁化学社製) 0.1 M

塩酸を用いて、pH 6.0に調製

## 【0139】

## (洗浄液 - B)

Tris-HCl (pH 7.5) 10 mM

塩化ナトリウム 0.5 M

エタノール 5 ~ 12.5 %

30

## 【0140】

## (回収液 - B)

Tris-HCl (pH 6.5) 1 mM

## 【0141】

## (7) 動物組織核酸混合物溶液調製

液体窒素で急速凍結したマウス肝臓をハサミで小破片とし、5 mg を 1.5 ml チューブにはかりとる。核酸可溶化試薬 - B1 を 350 µl を加え、Rotor-Stator ホモジナイザー (Polytron, KINEMATICA 社製) にて均一になるまでホモジナイズする。8000 × g にて3分間、室温にて遠心分離し、組織破片を取らないように新しい1.5 ml チューブに上清を移す。ここに核酸可溶化試薬 - B2 を 175 µl 加え、ボルテックスミキサーで15秒間攪拌する。さらに、99.5%以上特級エタノールを 175 µl 加え、ボルテックスミキサーで1分間攪拌する。

40

## 【0142】

## (8) RNA 分離精製操作

上記(1)及び(2)で作成した核酸吸着性多孔膜を有する核酸精製カートリッジの開口に注入し、続いて上記の開口に圧力差発生装置を結合し、核酸分離精製カートリ

50

ッジ内を加圧状態にし、注入した核酸を含む試料溶液を、核酸吸着性多孔膜に通過させることで、核酸吸着性多孔膜に接触させ、核酸分離精製カートリッジの他の開口より排出する。続いて、上記核酸分離精製カートリッジの上記一の開口に、エタノールを5～12.5%の濃度で含む洗浄液-Bを750μl注入し、上記一の開口に圧力差発生装置を結合し、核酸分離精製カートリッジ内を加圧状態にし、注入した洗浄液を核酸吸着性多孔膜に通過させ、他の開口より排出する。同様の操作を3回繰り返す。続いて、上記核酸分離精製カートリッジの上記一の開口に回収液-Bを100μl注入し、核酸分離精製カートリッジの上記一の開口に圧力差発生装置を結合して核酸分離精製カートリッジ内を加圧状態にし、注入した回収液を、核酸吸着性多孔膜に通過させ、他の開口より排出し、この液を回収する。

10

【0143】

【実施例3】

洗浄液-Bのエタノール濃度を30、20、0%とする以外は、(8)と同様に各操作を行なった。

【0144】

(9) 回収された核酸のアガロースゲル電気泳動

実施例2及び比較例2で精製された核酸を1%アガロースゲル電気泳動した。結果を図1に示す。

【0145】

(10) 回収された核酸の回収量

実施例2及び実施例3で回収された核酸を含む回収液の濃度を測定した。測定法は260nmの吸光度を使用する方法を用いた。結果を表3に示す。

20

【0146】

【表3】

	エタノール濃度	RNA回収量
C1	30.0%	23.1μg
C2	20.0%	21.7μg
E1	12.5%	23.9μg
E2	10.0%	24.9μg
E3	7.5%	23.2μg
E4	5.0%	20.7μg
C3	0%	19.0μg

30

【0147】

図1から明らかなように、実施例2の洗浄工程でのエタノール濃度が5～12.5%のときにはDNAの混入がほとんど認められない。これに対し、比較例2の洗浄工程でのエタノール濃度が20～30%のときにはDNAの混入があることが分かる。さらに、比較例2のエタノール濃度0%の場合は、DNAの混入がないものの、核酸回収量が低下する。

40

以上のことから本発明により、核酸回収液中のDNA混入量をかなり減少させ、RNAを選択的に高収量にて回収できることが分かる。

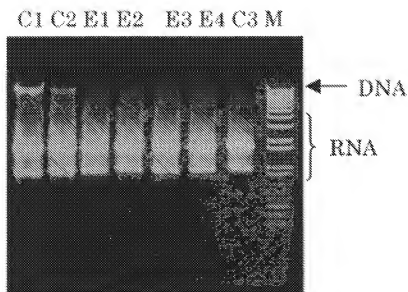
【図面の簡単な説明】

【0148】

【図1】実施例2及び比較例2で精製された核酸を1%アガロースゲル電気泳動した結果を示す図である。



【図 1】



C 2	比較例 2	エタノール濃度 30.0%
C 1	比較例 2	エタノール濃度 20.0%
E 1	実施例 2	エタノール濃度 12.5%
E 2	実施例 2	エタノール濃度 10.0%
E 3	実施例 2	エタノール濃度 7.5%
E 4	実施例 2	エタノール濃度 5.0%
C 3	比較例 2	エタノール濃度 0.0%
M	1 k b PLUS Ladder	

---

フロントページの続き

(72) 発明者 半戸 里江

埼玉県朝霞市泉水3丁目1番46号 富士写真フイルム株式会社内

Fターム(参考) 4E024 AA19 AA20 CA01 CA11 H011

4E029 A023 BB20 CC10